

# Compte rendu de l'atelier de travail sur le jaunissement mortel du cocotier au Mexique, organisé par le Cicy<sup>(1)</sup> à Merida, 15-20 novembre 1993

## *Acta del taller de trabajo sobre el amarillamiento letal del cocotero en México, organizado por el Cicy<sup>(1)</sup> en Merida, 15-20 de noviembre de 1993*

M. DOLLET<sup>(2)</sup>

Le jaunissement mortel du cocotier a touché le Mexique au début des années 80, voire peut-être en 1977. Depuis, le mal s'étend inexorablement. C'est pourquoi le CICY a organisé en novembre 1993 un groupe de travail auquel participaient les chercheurs du CICY, les agriculteurs mexicains concernés par la culture du cocotier et des chercheurs étrangers invités soit en fonction de leur expérience (qui ont déjà travaillé sur des maladies similaires), soit des pays limitrophes, pour information.

### LE JAUNISSEMENT MORTEL (J.M.) DU MEXIQUE

Les descriptions faites du J.M. par les chercheurs mexicains (J. Arellano, C. Oropeza -CICY-) ressemblent tout-à-fait à celles du Lethal Yellowing (L.Y.) de Floride ou de la Jamaïque.

La maladie se propage très rapidement. Arrivée par la pointe du Yucatan à la fin des années 70 - début des années 80, elle a maintenant atteint le Belize, au Sud, et l'état de Campeche sur la côte Nord. Au Tabasco, des cas non encore confirmés ont été signalés. Le front de la maladie a ainsi progressé de 700 km en 10 ans. L'insecte cixide *Myndus crudus*, présent partout au Mexique, est le vecteur présumé de la maladie, mais aucune preuve formelle n'a été apportée à ce jour.

Selon S. Eden-Green (NRI Angleterre), une étude comparative des jaunissements mortels, des Caraïbes, d'Afrique de l'Ouest, et d'Afrique de l'Est, montre que les trois types de maladie pourraient être dus à trois mycoplasmes différents. Ces présomptions reposent :

- sur les différences de résistance variétale : ainsi par exemple, ni le Vanuatu Tall, ni le Nain Vert de Sri Lanka ne sont atteints à ce jour au Ghana, alors que le Vanuatu Tall est très sensible au L.Y. à la Jamaïque (98%) et en Tanzanie (89%) ; le Nain Vert de Sri Lanka est très sensible à ce type de maladie en Tanzanie (70%), mais très tolérant en Floride (3%) ;

- sur le vecteur : en Tanzanie, aucune cicadelle de type *Myndus crudus* n'a pu être identifiée comme vectrice ; au Ghana, une espèce très voisine, *M. adiopodoumeensis*,

*El amarillamiento letal del cocotero ha afectado México a principios de los ochenta, incluso tal vez en 1977. Desde entonces, el mal se extiende de modo inexorable. Por esta razón el CICY ha organizado en noviembre de 1993 un grupo de trabajo al cual participaban sus investigadores, los agricultores mexicanos concernidos al cultivo del cocotero y los investigadores extranjeros convidados o sea según su experiencia (que trabajaron ya en enfermedades similares), o sea países aledaños, para información.*

### AMARILLAMIENTO LETAL (A.L.) DE MÉXICO

*Las descripciones hechas del A.L. por los investigadores mexicanos (J. Arellano, C. Oropeza - CICY-) se parecen completamente a las del Lethal Yellowing (L.Y.) de Florida o de Jamaica.*

*La enfermedad se propaga muy rápidamente. Llegó por la punta del Yucatan a fines de los setenta - principios de los ochenta, ha alcanzado ahora Belize, en el Sur, y el Estado de Campeche en la Costa Norte. En Tabasco, se señalaron casos aún sin confirmar. El frente de la enfermedad ha así progresado de 700 km en 10 años. El insecto cixide *Myndus crudus*, presente por todas partes en México, es el vector presunto de la enfermedad, pero hoy día no se ha alegado ninguna prueba formal.*

*Según S. Eden-Green (NRI Inglaterra), un estudio comparativo de los amarillamientos letales, de Caraïbes, de Africa del Oeste, de Africa del Este, muestra que los tres tipos de enfermedad podrían ser causados por tres micoplasmas diferentes. Esas presunciones se fundamentan en:*

- las diferencias de resistencia varietal: así por ejemplo, ni el Grande Vanuatu, ni el Enano Verde Sri Lanka están afectados hoy día en Ghana, mientras que el Grande Vanuatu es muy sensible al L. Y. en Jamaica (98%) y en Tanzania (89%); el Enano Verde Sri Lanka es muy sensible a este tipo de enfermedad en Tanzania (70%), pero muy resistente en Florida (3%);

- el vector: en Tanzania, no se ha podido identificar de vectora a ninguna cicadella del tipo *Myndus crudus*; en Ghana, una especie muy parecida, *M. adiopodoumeensis*,

(1) Centro de Investigaciones Científicas de Yucatan

(2) Unité de Recherches Défense des Cultures CIRAD-CP, Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes, B.P. 5035 Montpellier cedex 1, Francia

(1) Centro de Investigaciones Científicas de Yucatan

(2) Unité de Recherches Défense des Cultures CIRAD-CP, Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes, B.P. 5035 Montpellier cedex 1, Francia

existe, mais tous les essais d'introduction en masse, en cage, sont restés à ce jour sans résultat.

### DIAGNOSTIC ET DÉTECTION

Plusieurs équipes (P. Jones, Rothamsted, Grande Bretagne, N. Harrison aux Etats-Unis, C. Oropeza et A. Escamilla du CICY) essaient de mettre au point une méthode de détection de grande sensibilité, des mycoplasmes associés au jaunissement mortel.

Les travaux sont plus spécialement orientés sur la fabrication de sondes moléculaires spécifiques de la maladie.

N. Harrison a utilisé la technique PCR (Polymérase Chain Reaction) en utilisant deux petites molécules amorces (25 et 26 Mer) qui constituent un morceau de séquence du gène de l'ARN 16 S. La limite de détection ainsi obtenue est très fine (0,5 pg de DNA). mais malheureusement tous les organes de la plante ne donnent pas de diagnostic positif. De plus, il faut faire suivre ces amplifications par les techniques de RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) pour pouvoir différencier les mycoplasmes des différents jaunissements mortels.

Ce test de PCR auraient permis de détecter la présence de mycoplasmes dans des embryons de noix tombées ou récoltées sur cocotiers Grand de Panama et Nain Vert Malaisie malades de la Jamaïque. Ce résultat a suscité une vive émotion parmi le public présent car :

- tous les essais de transmission par la graine qui avaient été réalisés à la Jamaïque depuis plus de 30 ans s'étaient révélés tous négatifs ;

- parce qu'à ce jour, aucune maladie à mycoplasme ne s'est révélée être transmissible par la graine.

Toutes les études histologiques réalisées à ce jour par des mycoplasmodistes, et par des spécialistes en cytologie, tendaient à conclure qu'il était impossible qu'un mycoplasme puisse passer dans l'embryon. Par ailleurs, aucun contrôle sur noix d'arbre sain n'ayant été effectué, il a été proposé à l'équipe de N. Harrison :

- de contrôler ces résultats sur des embryons de noix récoltées sur des arbres sains ;

- de contrôler ces tests sur des cultures *in vitro* d'embryons en tube (embryons issus d'arbres malades et d'arbres sains).

### Ressources génétiques

D. Zizumbo *et al.* (CICY) ont publié en 1992 un article sur les variétés de cocotier du Mexique. Il a présenté les résultats consignés dans cet article insistant sur la grande variabilité des cocotiers du Mexique, Nains et Grands.

Aussi bien le Dr. B. Been de la Jamaïque que M. de Nucé de Lamothe (CIRAD), que J. Arellano, ont défendu les multiples avantages des hybrides. Le seul problème pour les Mexicains réside dans celui des introductions de nouvelles variétés au Mexique. Les résultats annoncés au cours de la réunion - détection positive de mycoplasmes dans l'embryon de cocotier - et les résultats publiés récemment par les chercheurs australiens sur la présence de molécules de type viroïdes dans les cocotiers, et demandant un embargo sur les échanges de germplasm, ont conduit les décideurs de la Protection des Végétaux de Mexico à être très restrictifs sur toute introduction.

A la demande du CICY, nous avons fait le point sur les risques encourus par un pays qui introduirait des noix de

*existe, pero todos los ensayos de introducción en masa, en jaula, hoy día no dieron resultados.*

### DIAGNOSTICO Y DETECCION

*Varios equipos (P. Jones, Rothamsted, Gran Bretaña, N. Harrison en Estados Unidos, C. Oropeza y A. Escamilla del CICY) intentan poner a punto un método de detección de gran sensibilidad, de los micoplasmas asociados al amarillamiento letal.*

*Se orientan más especialmente los trabajos en la fabricación de sondas moleculares específicas de la enfermedad.*

*N. Harrison utilizó la técnica PCR (Polimerasa, Reacción en cadena) al utilizar dos pequeñas moléculas cebos (25 y 26 Mer) que constituyen un pedazo de secuencia del gen ARN 16 S. El límite de detección así conseguido es muy fino (0,5 pg de DNA), pero desgraciadamente todos los órganos de la planta no dan diagnóstico positivo. Además, hay que mandar limitar estas amplificaciones mediante técnicas de RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) para poder diferenciar los micoplasmas de los diferentes amarillamientos letales.*

*Esta prueba de PCR habrá permitido detectar la presencia de micoplasmas en los embriones de nueces que se cayeron o cosechadas en cocoteros Grande de Panamá y Enano Verde Malasia enfermos en Jamaica. Este resultado impresionó mucho al público presente porque:*

- todos los ensayos de transmisión por semilla que se habían realizados en Jamaica desde hace más de 30 años se habían revelado negativos todos;*

- porque hoy en día, ninguna enfermedad de micoplasma se ha revelado ser transmisible por semilla.*

*— Todos los estudios histológicos realizados el día de hoy por micoplasmodistas, y por especialistas en citología, se encaminaban a concluir que era imposible que un micoplasma pueda pasar en el embrión. Por otro lado, no habiendo realizado ningún control en nueces de árbol sano, se ha propuesto al equipo de N. Harrison:*

- controlar los resultados en embriones de nueces cosechadas en árboles sanos;*

- controlar estas pruebas en cultivos in vitro de embriones en tubo (embriones oriundos de árboles enfermos y árboles sanos).*

### Recursos genéticos

*D. Zizumbo et al. (CICY) publicaron en 1992 un artículo sobre las variedades de cocotero de México. Presentó los resultados sentados en este artículo insistiendo en la gran variabilidad de los cocoteros de México. Enanos y Grandes.*

*Tanto el Dr B. Been de Jamaica como el Señor M. de Nucé de Lamothe (CIRAD), y J. Arellano, han defendido las varias ventajas de los híbridos. El único problema para los mexicanos consiste en el de las introducciones de nuevas variedades en México. Los resultados anunciados durante la reunión - detección positiva de Micoplasma en el embrión de cocotero - y los resultados que investigadores australianos publicaron recientemente sobre la presencia de moléculas de tipo viroïdes en los cocoteros, y que requerían un embargo sobre los intercambios de germplasm, han llevado los responsables de Sanidad Vegetal de México a limitar fuertemente cualquier introducción.*

*A instancia del CICY, hemos analizado los riesgos a que se exponía un país que introduciría nueces de cocoteros oriundas*

cocotiers de différentes parties du monde. Notre communication démontrait que les avantages liés à l'introduction de nouveau matériel végétal étaient de très loin supérieurs aux éventuels désavantages. En fait, à ce jour, il n'y a aucune preuve véritable de transmission d'une maladie du cocotier par la graine. Seul, le Cadang-Cadang aux Philippines (et peut-être aux îles Salomon sur palmier) pourrait éventuellement (?) être transmis par la graine. Nous avons également insisté sur le fait que ce n'est pas parce que l'on détectera un virus, un viroïde, ou un mycoplasme dans une graine qu'il y aura forcément transmission de la maladie (cela a longuement été démontré pour de nombreux autres systèmes plantes-virus).

### MÉTHODES DE LUTTE

Tout le monde s'accorde à penser que la recherche de variétés (ou hybrides) tolérants est la voie la plus prometteuse. R. Ashburner a présenté l'état des connaissances sur la reproduction du cocotier et les nouvelles approches de caractérisation des variétés par RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et VNTR (Variable Number Tandem Repeats).

Enfin, R. Hornung (Wye College), et Mme Buffard Morel (ORSTOM Montpellier), ont présenté les derniers résultats obtenus dans la culture *in vitro* par embryogenèse somatique du cocotier.

### DISCUSSIONS - RECOMMANDATIONS

— Les progrès réalisés en biologie moléculaire pour le diagnostic sont très encourageants, mais les recherches devront être poursuivies pour les rendre plus fiables.

*de diferentes partes del mundo. Nuestro comunicado demostraba que las ventajas vinculadas con la introducción de un nuevo material vegetal eran de muy lejos superiores a las posibles desventajas. De hecho, hoy en día, no existe ninguna verdadera prueba de transmisión de una enfermedad del cocotero por semilla. Sólo, el Cadang-Cadang en Filipinas (y tal vez en las islas Salomón en palmera) podría eventualmente (?) ser transmitido por semilla. También hemos insistido sobre el hecho de que no es porque se vaya a detectar un virus, un viroide, o un micoplasma en una semilla que forzosamente habrá transmisión de la enfermedad, lo que se ha demostrado detenidamente para numerosos otros sistemas plantas-virus.*

### MÉTODOS DE CONTROL

*Todos concordan en pensar que la investigación de variedades (o híbridos) resistentes es la vía más prometedora. R. Ashburner presentó el estado de los conocimientos sobre la reproducción del cocotero y los nuevos enfoques de caracterización de las variedades por RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) y VNTR (Variable Number Tandem Repeats).*

*Por último, R. Hornung (Wye College), y la Señora Buffard Morel (ORSTOM Montpellier) presentaron los últimos resultados conseguidos en el cultivo *in vitro* por embriogenesis somática del cocotero.*

### DISCUSIONES -RECOMENDACIONES

*— Los adelantos realizados en biología molecular para el diagnóstico son muy alentadores, amigos tenemos que proseguir las investigaciones para hacerlos más fiables.*



FIG. 1. — Cocoteraie du Yucatan ravagée par la maladie du jaunissement mortel — (Cocoteros del Yucatan devastados por la enfermedad del amarillamiento letal)

— Il a été recommandé une attention spéciale sur la physiologie et l'anatomie des graines par rapport au problème de l'éventuelle transmission par la semence

— Il faut mettre en place sans tarder des champs de comportement variétal par rapport au J.M. dans les zones encore non atteintes, en utilisant au maximum les ressources locales. Les techniques de culture *in vitro* - culture d'embryons zygotiques et embryogenèse somatique- pourront, dans un avenir proche, aider à cette tâche si les recherches sont poursuivies dans ce domaine.

— Il faut chercher des méthodes de lutte contre le vecteur.

— Un gros effort doit être fait au niveau de la diversification des produits du cocotier et de la vulgarisation.

### CONCLUSION

En conclusion, il faut reconnaître que cet atelier de travail a été un véritable carrefour, tant au niveau des échanges scientifiques, qu'au niveau du choix de politique de la recherche cocotier au Mexique. La présence d'agriculteurs, de chercheurs mexicains du CICY et d'autres états, des responsables de la Protection des Végétaux de Mexico et des chercheurs étrangers, a permis un large brassage d'idées et éclairé les chercheurs du CICY dans le choix prioritaires de leur stratégie, car il est urgent pour le Mexique de trouver une parade à ce véritable fléau que constitue le jaunissement mortel (Fig. 1).

N.B. — Le compte rendu de cet atelier de travail n'engage que l'auteur. Les communications et les recommandations adoptées lors de cette réunion devraient être officiellement publiées prochainement par le CICY.

— *Se ha recomendado prestar una atención especial a la fisiología y a la anatomía de las semillas con respecto al problema de una eventual transmisión por semilla.*

— *Hay que implantar sin tardar campos de comportamiento varietal en comparación con los A.L. en zonas que no están afectadas aún, al utilizar al máximo los recursos locales. Las técnicas de cultivo in vitro - cultivo de embriones zigóticos y embriogenesis estomática - podrán, en un futuro venidero, ayudar en esta tarea si las investigaciones se prosiguen en este ámbito.*

— *Hay que buscar métodos de control del vector.*

— *Hay que procurar esforzarse en sumo grado en diversificar los productos del cocotero y divulgarlos.*

### CONCLUSION

*En resumidas cuentas, hay que reconocer que este taller de trabajo fue una verdadera tribuna, tanto al nivel de los intercambios científicos, como al nivel de la selección de política de la investigación cocotero en México. La presencia de Agricultores, de investigadores mexicanos del CICY y de otros estados, de los responsables de Sanidad Vegetal de México y de investigadores extranjeros, ha permitido un amplio removido de ideas y ha instruido los investigadores del CICY para elegir su estrategia en forma prioritaria, porque es urgente que México encuentre un alarde a este verdadero mayal que constituye el amarillamiento letal. (Fig. 1)*

*N.B. — El informe de este taller de trabajo no implica sino al autor. Las comunicaciones y las recomendaciones adoptadas cuando esta reunión deberían oficialmente ser publicadas próximamente por el CICY.*